

## METHOD AND SYSTEM FOR ANALYZING MICRO AMOUNT WITH THERMAL LENS MICROSCOPE

Patent number: JP2000356611

Publication date: 2000-12-26

Inventor: KITAMORI TAKEHIKO; SAWADA SHIRO

Applicant: KANAGAWA KAGAKU GIJUTSU AKAD

Classification:

- international: G01N25/16; G02B21/00; G01N25/00; G02B21/00;  
(IPC1-7): G01N25/16; G02B21/00

- european:

Application number: JP19990168772 19990615

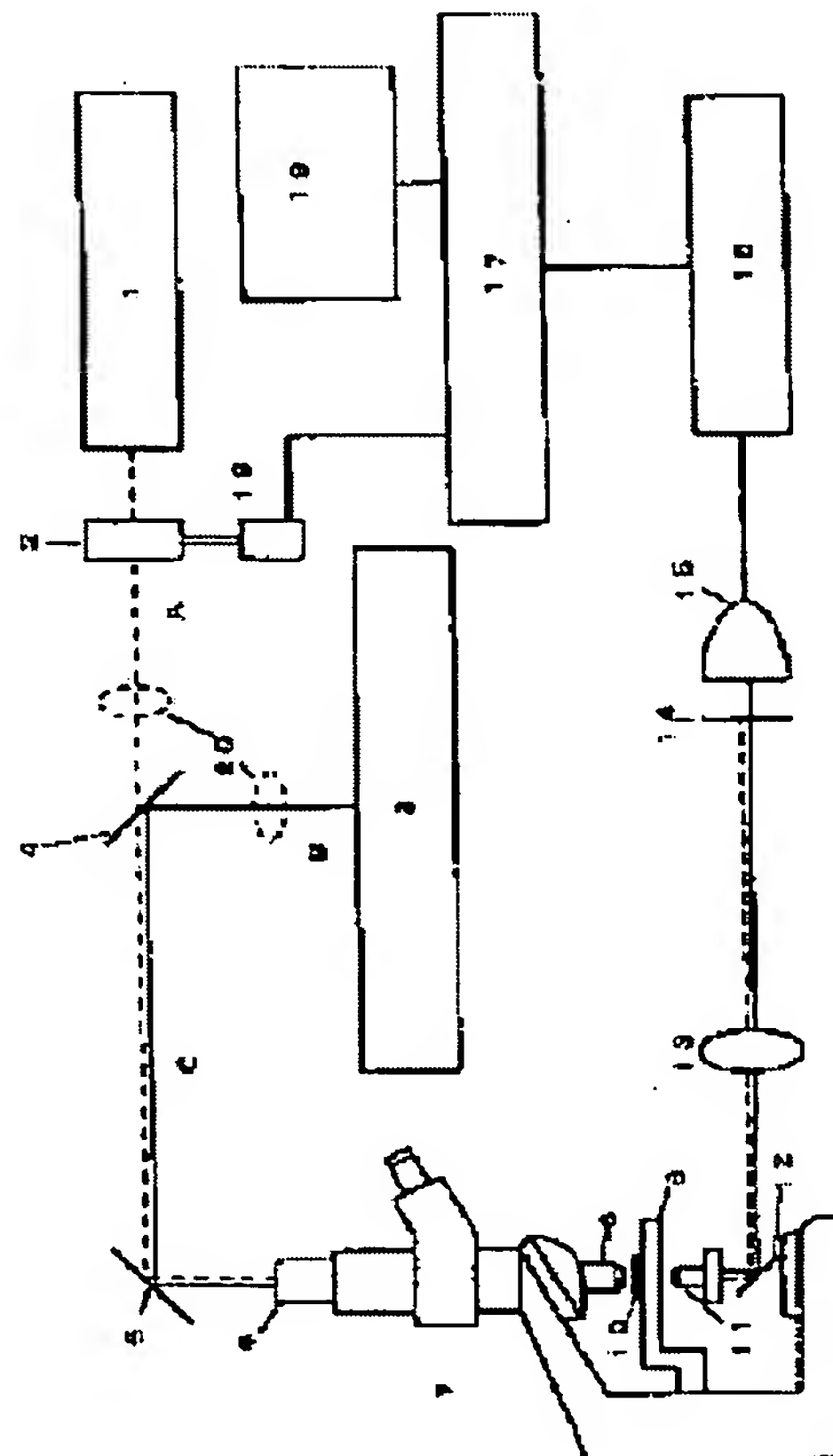
Priority number(s): JP19990168772 19990615

Report a data error here

### Abstract of JP2000356611

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a method and system for analyzing a micro amount with a thermal lens microscope, easy to handle with no limit in measuring object, and capable of analyzing with high resolution.

**SOLUTION:** This method for analyzing a micro amount with a thermal lens microscope applies detecting light B to a thermal lens formed by applying excited incident light A into a sample 10, measures the diffusion after transmission therethrough of the detecting light B by the thermal lens, and thereby detects a substance in the sample 10, in an optical microscope. The optical adjustment is made so that the focus of the excited light A is in no coincident with that of the detecting light B, in the sample 10.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-356611

(P2000-356611A)

(43) 公開日 平成12年12月26日 (2000. 12. 26)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 25/16

G 0 1 N 25/16

C 2 G 0 4 0

G 0 2 B 21/00

G 0 2 B 21/00

2 H 0 5 2

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平11-168772

(22) 出願日 平成11年 6 月15日 (1999. 6. 15)

特許法第30条第1項適用申請有り 1998年12月15日発行  
の日本工業新聞に掲載

(71) 出願人 591243103

財団法人神奈川科学技術アカデミー

神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 2 番 1 号

(72) 発明者 北森 武彦

千葉県松戸市松戸 2172-1-308

(72) 発明者 澤田 嗣郎

東京都荒川区南千住 6-37-2-504

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

Fターム(参考) 2G040 AA02 AB07 AB12 BA18 BA24

BA27 CA03 CA12 CA18 CA23

EA06 EB02 FA10 HA02

2H052 AA00 AA07 AB01 AB26 AC05

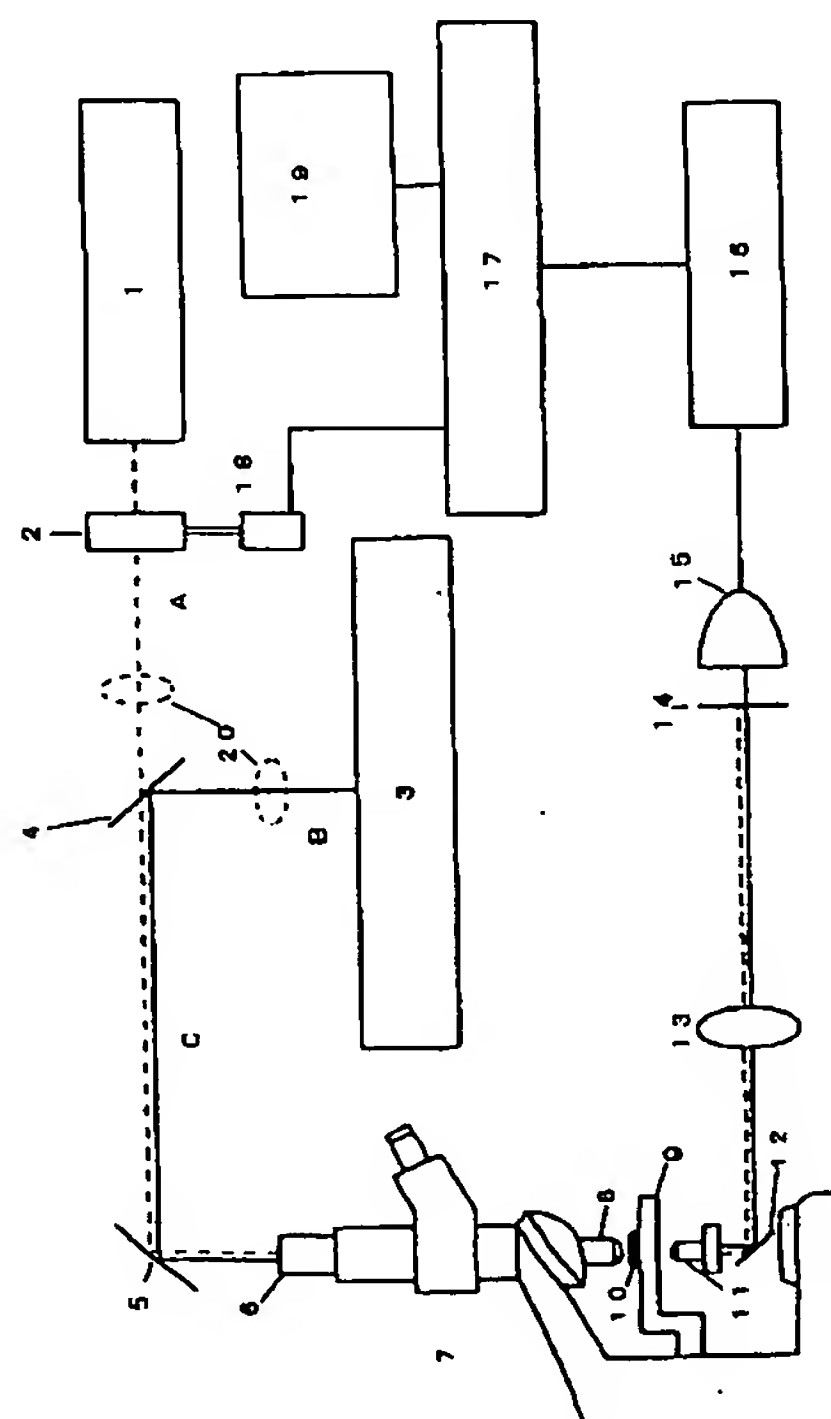
AC14 AC34 AF06

(54) 【発明の名称】 熱レンズ顕微鏡超微量分析方法とその装置

(57) 【要約】

【課題】 操作が簡便であり、かつ、測定対象が限定されることなく、高い分解能による分析が可能となる熱レンズ顕微鏡超微量分析方法とその装置を提供する。

【解決手段】 光学顕微鏡において、励起光 (A) を入射し、励起光 (A) が試料 (10) 中に照射されることにより形成される熱レンズに検出光 (B) を入射し、熱レンズによる検出光 (B) の試料透過後の拡散を測定することにより試料 (10) 中の物質を検出を行う熱レンズ顕微鏡を用いた超微量分析方法であって、光学的調整により、試料 (10) 中における励起光 (A) および検出光 (B) の焦点位置が一致しないようにする。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 光学顕微鏡において、励起光を入射し、励起光が試料中に照射されることにより形成される熱レンズに検出光を入射し、熱レンズによる試料透過後の検出光の拡散を測定することにより試料中の物質の検出を行う熱レンズ顕微鏡を用いた超微量分析方法であって、光学的調整により、試料中における励起光および検出光の焦点位置が一致しないようにすることを特徴とする熱レンズ顕微鏡超微量分析方法。

【請求項 2】 励起光と検出光の周波数を異なるものとし、色収差のあるレンズを対物レンズとして用いることにより、試料中における励起光および検出光の焦点位置が一致しないようにする請求項 1 記載の熱レンズ顕微鏡超微量分析方法。

【請求項 3】 励起光または検出光のいずれかを角度を持たせて光学顕微鏡へ入射することにより、試料中における励起光および検出光の焦点位置が一致しないようにする請求項 1 記載の熱レンズ顕微鏡超微量分析方法。

【請求項 4】 光学顕微鏡としての接眼レンズと対物レンズ並びに試料ステージを備えた請求項 1 の方法のための装置であって、励起光と検出光の光源と、試料中での励起光と検出光の焦点位置を一致させない光学調整装置と、試料透過光の集光装置とを有し、励起光と検出光とは接眼レンズに入射されて対物レンズより試料ステージ上の試料に放射され、光学調整装置によって励起光と検出光の試料中の焦点位置は一致しないようにされ、試料透過光は集光装置により集光されて透過光のうちの検出光のみから分析が行われることを特徴とする熱レンズ顕微鏡超微量分析装置。

【請求項 5】 励起光と検出光の周波数を異なるものとした請求項 4 の装置であって、色収差のあるレンズを対物レンズとして光学調整装置を構成している熱レンズ顕微鏡超微量分析装置。

【請求項 6】 請求項 4 の装置であって、ビームエキスパンダーにより、励起光または検出光のいずれかを角度を持たせて光学顕微鏡に入射するようにして光学調整装置を構成している熱レンズ顕微鏡超微量分析装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 この出願の発明は、熱レンズ顕微鏡超微量分析方法とその装置に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、光学顕微鏡系として熱レンズ顕微鏡を構成し、微小空間内の超微量な試料物質を高精度に高空間分解能で分析することを可能とする超微量分析方法とそのための装置に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術とその課題】 半導体や生体試料、あるいは各種の液体試料等の分析や測定を目的として分光分析法が広く利用されてきている。しかし、これまでの分光分

析法では、微小空間での微量あるいは微小物質を分析する場合には、測定条件として真空が必要であったり、電子ビームやイオンビームの利用等の使用にともなって、試料が破壊ないし損傷される等の問題があった。また、溶液あるいは生体組織中等の超微量の試料を扱う場合には、光学領域の顕微鏡の使用が必須となるが、高精度で高い空間分解能での分析が必要とされるこのような光学領域の顕微鏡として实际的に利用されているのはレーザー蛍光顕微鏡に限られており、このため、分析の対象もおのずとレーザー蛍光顕微鏡蛍光分子に限られている。このような事情から、従来では、真空場を必要とすることがなく、非接触、非損傷での分析が可能であって、しかも分析対象が蛍光分子に限定されることなしに、高精度で、高い空間分解能での分析が可能とされる光学顕微鏡の実現が求められていた。

【0003】そこで、従来より、これらの要求を満たすものとして光熱変換現象による熱レンズ効果を利用した熱レンズ顕微鏡が注目されてきた。しかしながら、実際には、光学顕微鏡として、つまり、接眼レンズと対物レンズというレンズ構成による光学顕微鏡で熱レンズ顕微鏡を実現することは極めて困難であった。

【0004】熱レンズ顕微鏡では、励起光と検出光との関係を、励起光が試料中に入射されることにより形成される熱レンズに検出光を入射し、試料透過後の検出光の拡散から試料物質の検出を行うものとするのが欠かせない。しかし、光学顕微鏡の構成では、励起光と検出光の焦点位置が一致してしまうことから、上記の関係は、実現困難であると考えられてきた。

【0005】もちろん、これまでもいくつかの工夫が提案されている。しかし、いずれの場合も、操作が複雑過ぎるなどの理由から、具体化されなかった。そこで、この出願の発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、操作が単純であり、かつ、測定対象が限定されることなく、高精度で高い空間分解能による分析が光学顕微鏡の構成で可能となる、新しい熱レンズ顕微鏡超微量分析方法とその装置を提供することを課題としている。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第 1 には、光学顕微鏡において、励起光を入射し、励起光が試料中に照射されることにより形成される熱レンズに検出光を入射し、熱レンズによる検出光の拡散を測定することにより試料中の物質を検出を行う熱レンズ顕微鏡を用いた超微量分析方法であって、光学的調整により、試料中における励起光および検出光の焦点位置が一致しないようにすることを特徴とする熱レンズ顕微鏡超微量分析方法を提供する。

【0007】また、この出願の発明は、第 2 には、励起光と検出光の周波数を異なるものとし、色収差のあるレンズを対物レンズとして用いることにより、試料中にお



ける励起光および検出光の焦点位置が一致しないようにする熱レンズ顕微鏡超微量分析方法を、第3には、励起光または検出光のいずれかを角度を持たせて光学顕微鏡へ入射することにより、試料中における励起光および検出光の焦点位置が一致しないようにする熱レンズ顕微鏡超微量分析方法も提供する。

【0008】そして、この出願の発明は、第4には、光学顕微鏡としての接眼レンズと対物レンズ並びに試料ステージを備えた請求項1の方法のための装置であって、励起光と検出光の光源と、試料中での励起光と検出光の焦点位置を一致させない光学調整装置と、試料透過光の集光装置とを有し、励起光と検出光とは接眼レンズに入射されて対物レンズより試料ステージ上の試料に放射され、光学調整装置によって励起光と検出光の試料中の焦点位置は一致しないようにされ、試料透過光は集光装置により集光されて透過光のうちの検出光のみから分析が行われることを特徴とする熱レンズ顕微鏡超微量分析装置を提供する。さらにまた、この出願の発明は、第5には、励起光と検出光の周波数を異なるものとした請求項4の装置であって、色収差のあるレンズを対物レンズとして光学調整装置を構成している熱レンズ顕微鏡超微量分析装置を、第6には、第4の発明の装置であって、ビームエキスパンダーにより、励起光または検出光のいずれかを角度を持たせて光学顕微鏡に入射するようにして光学調整装置を構成している熱レンズ顕微鏡超微量分析装置を提供する。

#### 【0009】

【発明の実施の形態】この出願の発明は、上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態についてさらに詳しく説明する。なによりもこの出願の発明では、励起光と検出光の焦点位置を光学的調整によって一致しないようにすることで、光学顕微鏡系であって、しかも熱レンズ顕微鏡であることを特徴としている。

【0010】ここで、光学顕微鏡、あるいは光学顕微鏡系との規定は、接眼レンズと対物レンズとのレンズ構成を有しているもの、あるいは、さらにはこれに加えて、対物レンズに対向する試料ステージを有しているものを意味している。そして、この発明の装置は、前記のとおり、光学顕微鏡としての接眼レンズと対物レンズ並びに試料ステージを備えた装置であって、励起光と検出光の光源と、試料中での励起光と検出光の焦点位置を一致させない光学調整装置と、試料透過光の集光装置とを有し、励起光と検出光とは接眼レンズに入射されて対物レンズより試料ステージ上の試料に放射され、光学調整装置によって励起光と検出光の試料中の焦点位置は一致しないようにされ、試料透過光は集光装置により集光されて透過光のうちの検出光のみから分析が行われることを特徴としている。

【0011】図1は、この出願の発明に係る熱レンズ顕微鏡超微量分析方法とその装置の一つの実施の形態を例

示した構成概略図である。この例において、励起光

(A)は励起光源(1)から出力される。励起光源(1)から出力された励起光(A)は、チョッパ(2)によって変調される。また、検出光源(3)から出力された検出光(B)は、ダイクロックミラー(4)により、変調後の励起光(A)と同軸にて合成される。励起光(A)と検出光(B)からなる合成光(C)は、反射ミラー(5)によって反射され、接眼レンズ(6)から光学顕微鏡(7)内部へ入射される。励起光源(1)および検出光源(3)には、たとえば、アルゴンレーザー光源やヘリウムネオンレーザー光源といった各種レーザー光源が適宜に用いられる。

【0012】光学顕微鏡(7)内部に入射された合成光(C)は、対物レンズ(8)より出力され、ステージ(9)に設置された試料(10)に照射される。試料内部においては、合成光(C)を構成する励起光(A)の一部により光熱変換現象に基づき熱レンズが形成され、熱レンズを通過した検出光(B)は拡散し、光熱変換に関わらなかった励起光(A)とともに試料中を透過する。原理的には励起光(A)も熱レンズの影響を受けるが、検出光(B)に比べてわずかである。ステージ

(9)は水平方向、垂直方向に移動することが可能であり、水平方向に移動することにより、2次元走査分析が可能である。

【0013】試料(10)を透過した合成光(C)は、ピンホール(11)を経て集光される。集光された合成光(C)は反射ミラー(12)によってレンズ(13)に入力されさらに集光され、フィルタ(14)へ入力される。フィルタ(14)により、合成光(C)を構成する成分としての励起光(A)の成分は遮断され、検出光(B)の成分が、フォトダイオード(15)に入力され、電気信号に変換される。電気信号は、プリアンプ(16)によって増幅されロックインアンプ(17)に入力され、チョッパ(2)を制御するチョッパ制御装置(18)からのリファレンス信号と併せて計測される。ロックインアンプ(17)から出力される計測結果を示す信号は、コンピュータ(19)に入力され、試料(10)の分析がなされる。

【0014】そして、この発明では、熱レンズ顕微鏡超微量分析を行うために、対物レンズ(8)より試料(10)中へ入射される励起光(A)と検出光(B)の焦点位置が一致しないようにする。そのための光学調整法としては、たとえば励起光(A)と検出光(B)の周波数を異なるものとし、色収差のあるレンズを対物レンズ(8)として用いる方法がある。また、ビームエキスパンダー(20)を用いて、励起光(A)または検出光(B)のいずれに角度を持たせて光学顕微鏡(7)の接眼レンズ(6)へ入射する方法が挙げられる。後者の方法については、原理的には励起光(A)と検出光(B)のどちらに対してもビームエキスパンダー(20)を用

いてもよいが、ビームエキスパンダー(20)を構成する光学素子による機械的な振動の発生とより精度の高い分析のためには検出光(B)は安定した状態であることが望ましいことを考慮すると、励起光(A)に対してビームエキスパンダー(20)を適用することが好ましい。

【0015】以上の特徴について、以下に実施例を示し、さらに具体的に説明する。

#### 【0016】

##### 【実施例】実施例1

この出願の発明に係る熱レンズ顕微鏡超微量分析の空間分解能を、図1の構成の装置において、銀薄膜を蒸着したガラス基板を用いた分析として評価した。励起光源として、アルゴンレーザー光源を用いた。また、検出光源として、ヘリウムネオンレーザー光源を用いた。励起光と検出光の焦点位置が一致しないように色収差のあるレンズを対物レンズ(8)として用いた。

【0017】銀薄膜が蒸着されたガラス基板を1方向へ走査し、透過光の強度を電圧として測定した結果を図2に示す。図2より明らかなように、銀薄膜端点が信号が立ち上がっている。これより、この装置の空間分解能が約 $1.0\mu\text{m}$ であることがわかる。このことから、空間分解能は、検出光のスポット径に等しく、この出願の発明に係る熱レンズ顕微鏡超微量分析は、微粒子の検出に優れた能力を持つことがわかる。

##### 実施例2

熱レンズ信号が吸光度に比例することを利用して、この出願の発明に係る熱レンズ顕微鏡超微量分析による濃度分布の定量的な画像化を試みた。

【0018】具体例として、抗生物質トブラマイシンが尿細管の組織内に取りこまれていく経時変化の画像化を行った。金コロイドで標識した抗体を用いてトブラマイシンを免疫染色した。励起光源として、アルゴンレーザー光源を用いた。また、検出光源として、ヘリウムネオンレーザー光源を用いた。励起光と検出光の焦点位置が一致しないように色収差のあるレンズを対物レンズとして用いた。

【0019】図3に、定量測定した結果を示した。比較例として、図4に、同じ測定対象に対する反射型共焦点レーザー顕微鏡による定量測定結果を示した。図3および図4において、a)からd)は、それぞれトブラマイシンを摂取してから、0時間後、1時間後、4時間後、8時間後の画像である。トブラマイシンに対する良好な検量線も得られており、検量線との対比からb)、c)、d)の画像でそれぞれ、組織内に $10\text{fmol}$ 、 $5\text{fmol}$ 、 $1\text{fmol}$ のトブラマイシンが存在していると推定される。また、時間が経つにつれて、トブラマイシンが尿細管組織から排出されていく様子も知ることができる。

【0020】図3と図4の比較により、共焦点レーザー

顕微鏡による画像(図4)では、標識金コロイドに対応すると考えられる輝点が離散的に見えるのに対して、この発明の熱レンズ顕微鏡超微量分析による画像(図3)では、滑らかな連続的な分布が得られている。代謝過程や組織構造から考えて、トブラマイシンが離散的に分布することは考えにくく、この発明の熱レンズ顕微鏡超微量分析による画像の方が正確かつ定量的に分布像を示していると考えられる。

##### 実施例3

10 さらに、この出願の発明に係る熱レンズ顕微鏡超微量分析を、小型ゲルを用いた短距離電気泳動によるDNAの高空間分解検出に適用した。

【0021】図5はその状態の概要を示したものである。この図5においては、励起光(51)と検出光(52)がゲル(53)中の試料バンド(54)に対物レンズ(60)を介して照射される。熱レンズ(55)が利用されている。透光した光はピンホール(56)、フィルター(57)、集光レンズ(58)を介して集光され、透過した検出光のみがフォトダイオード(59)において検知されることになる。この検知により分析が可能とされる。

20 【0022】ガラスプレートを用いて、縦 $25\text{mm}$ 、横 $28\text{mm}$ 、厚さ $80\mu\text{m}$ である小型の不連続ポリアクリルアミドゲル(濃縮ゲル:長さ $5\text{mm}$ 、 $3\%T$ 、 $3\%C$ 、緩衝液 $\text{pH}6.8\text{Tris}/\text{HCl}$ 、分離ゲル:長さ $70\text{mm}$ 、 $7.5\%T$ 、 $3\%C$ 、緩衝液 $\text{pH}8.8\text{Tris}/\text{HCl}$ )を作成した。試料として、 $10\text{base pair ladder (bpl)}$  DNA試料を用いた。電極緩衝液には、 $\text{pH}8.3\text{Tris}/\text{Glycine}$ 溶液を用い、 $30\sim 120\text{V}/\text{cm}$ の電場で、 $3\sim 5$ 分間電気泳動分離を行った。DNA分離パターンを銀染色した後、図1に例示した構成の装置を用いて検出を行った。励起光源として、アルゴンレーザー光源を用いた。また、検出光源として、ヘリウムネオンレーザー光源を用いた。励起光と検出光の焦点位置が一致しないように色収差のあるレンズを対物レンズとして用いた。

30 【0023】図6に示すように、実際に得られたDNA試料のバンド幅は $100\mu\text{m}$ であり、これは従来の大きさのゲルを用いた場合の約 $1/10$ の幅である。分離に要した泳動距離は $16\text{mm}$ 、時間は $15$ 分であり、これは従来の大きさのゲルを用いた場合の $10$ 倍以上速い。分離された各試料バンドは、肉眼では約 $1500\text{bp}$ までしか検出できないが、この出願の発明に係る熱レンズ顕微鏡超微量分析により $2400\text{bp}$ までの検出が可能であった。

40 【0024】以上より、この出願の発明に係る熱レンズ顕微鏡超微量分析は、優れた空間分解能を有しており、また、この空間分解能を利用した小型試料の測定も可能となり、測定時間の短縮に貢献することがわかった。

50 【0025】

【発明の効果】この出願の発明により、空間分解能や定量分析能力に優れ、かつ、生体細胞や組織などの *in vitro*、*in vivo* 測定が可能である光学顕微鏡の構成として、超微量分析顕微鏡が実現する。さらに、高い空間分解能や定量分析能力を応用することにより、試料を小型化し、分析時間を大幅に短縮することや試料量を低減することも可能となる。

【0026】また、光熱変換分工法の利点や特徴を有することから、熱拡散率や比熱などの熱物性物理量の分布測定や超光速時間分解測定などにも応用可能であると考えられる。以上より、この出願の発明に係る熱レンズ顕微鏡超微量分析装置が、今後の材料開発や物理化学研究、生体工学研究などに対して極めて有効な手段となることが期待される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】この出願の発明に係る熱レンズ顕微鏡超微量分析装置の実施形態を例示した構成概略図である。

【図2】この出願の発明の実施例1におけるガラス基板上銀蒸着膜の1次元走査測定結果を示した図である。

【図3】この出願の発明の実施例2において、この出願の発明に係る熱レンズ顕微鏡超微量分析装置により画像化された、金コロイド免疫染色した尿細管組織中のトブラマイシン分布像を示した図である。

【図4】反射型共焦点レーザー顕微鏡により画像化された、金コロイド免疫染色した尿細管組織中のトブラマイシン分布像を示した図である。

【図5】この出願の発明の実施例3における小型ゲルを用いた短距離電気泳動によるDNAの高空間分解検出を示す概略図である。

【図6】この出願の発明の実施例3における測定結果を示した図である。

#### 【符号の説明】

A 励起光

\* B 検出光

C 合成光

1 励起光源

2 チョッパ

3 検出光源

4 ダイクロックミラー

5 反射ミラー

6 接眼レンズ

7 光学顕微鏡

8 対物レンズ

9 ステージ

10 試料

11 ピンホール

12 反射ミラー

13 レンズ

14 フィルタ

15 フォトダイオード

16 プリアンプ

17 ロックインアンプ

18 チョッパ制御装置

19 コンピュータ

20 ビームエキスパンダー

51 励起光

52 検出光

53 ゲル

54 試料バンド

55 熱レンズ

56 ピンホール

57 フィルター

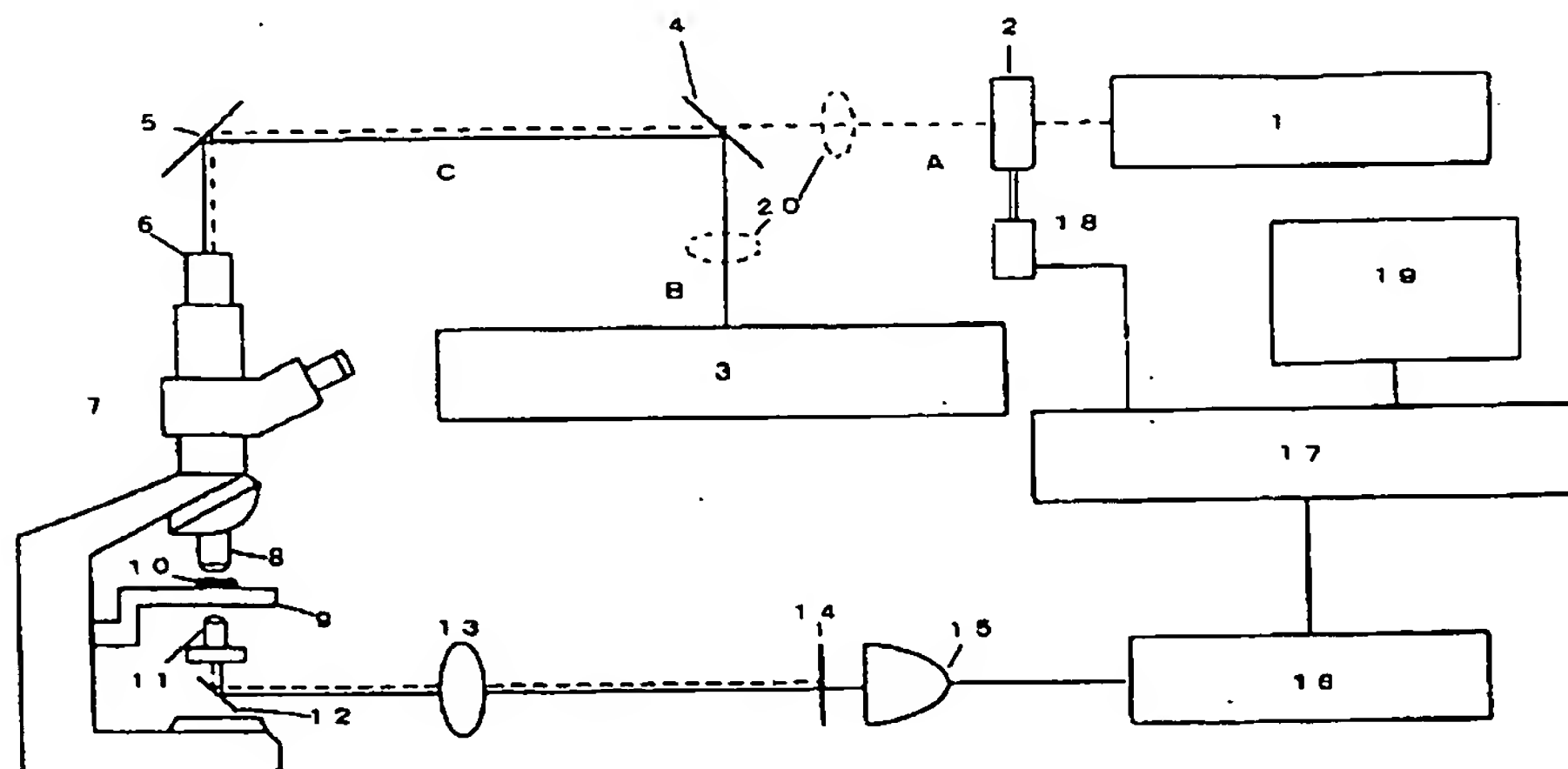
58 集光レンズ

59 フォトダイオード

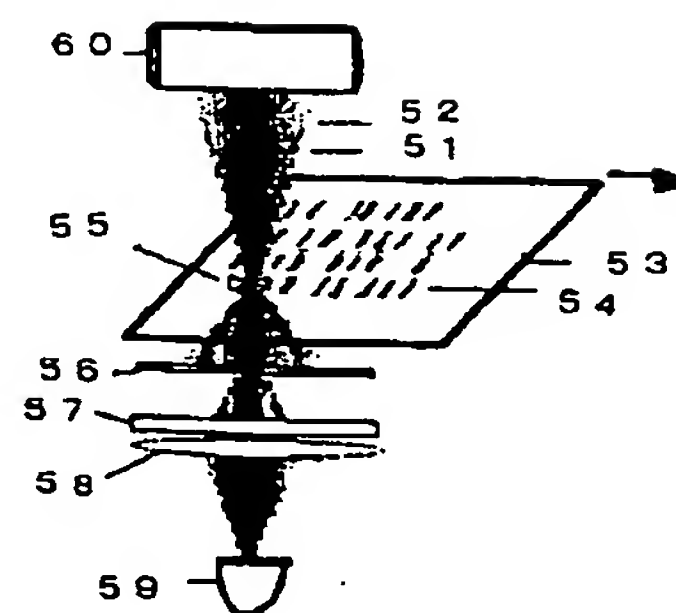
60 対物レンズ

\*

【図1】

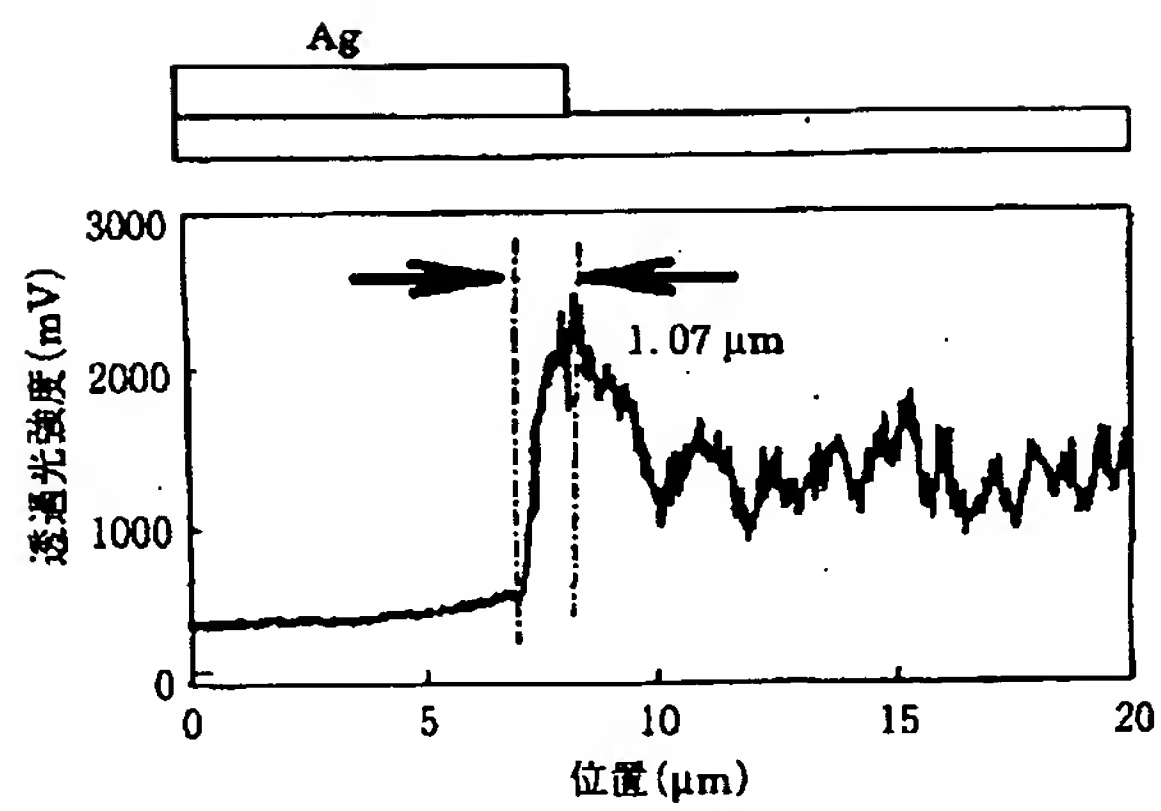


【図5】

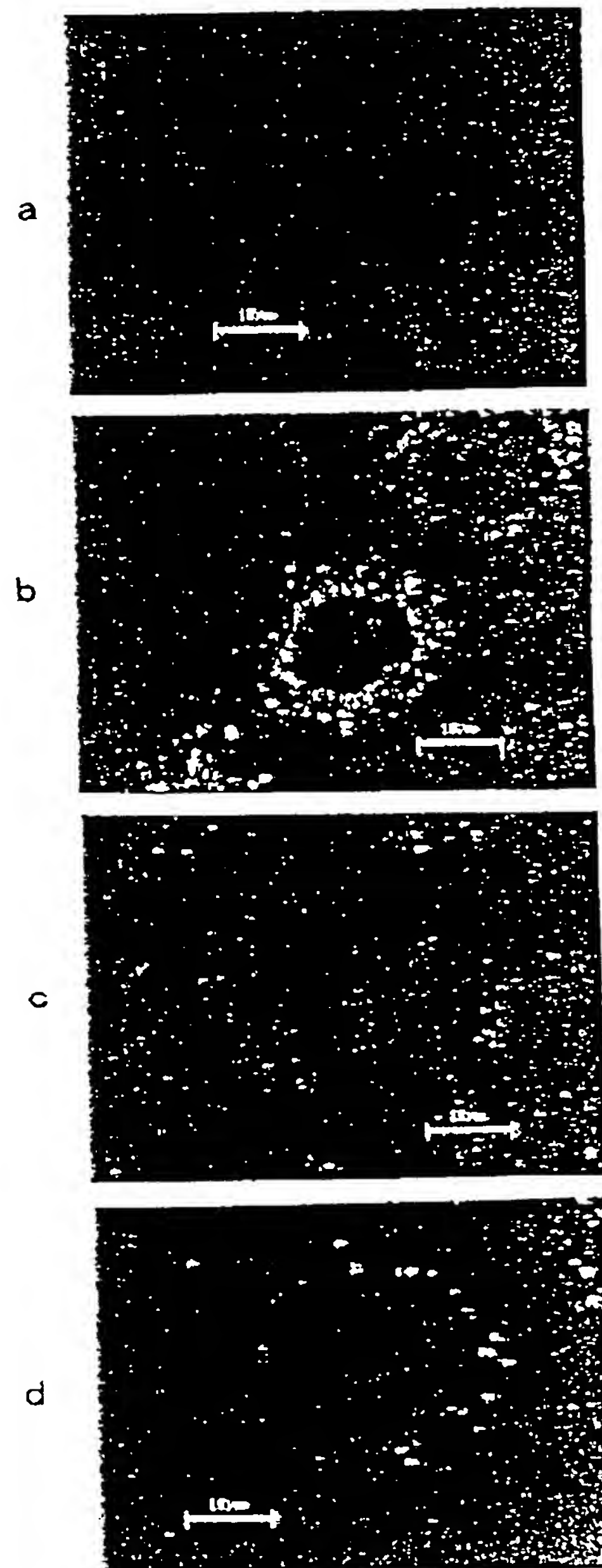




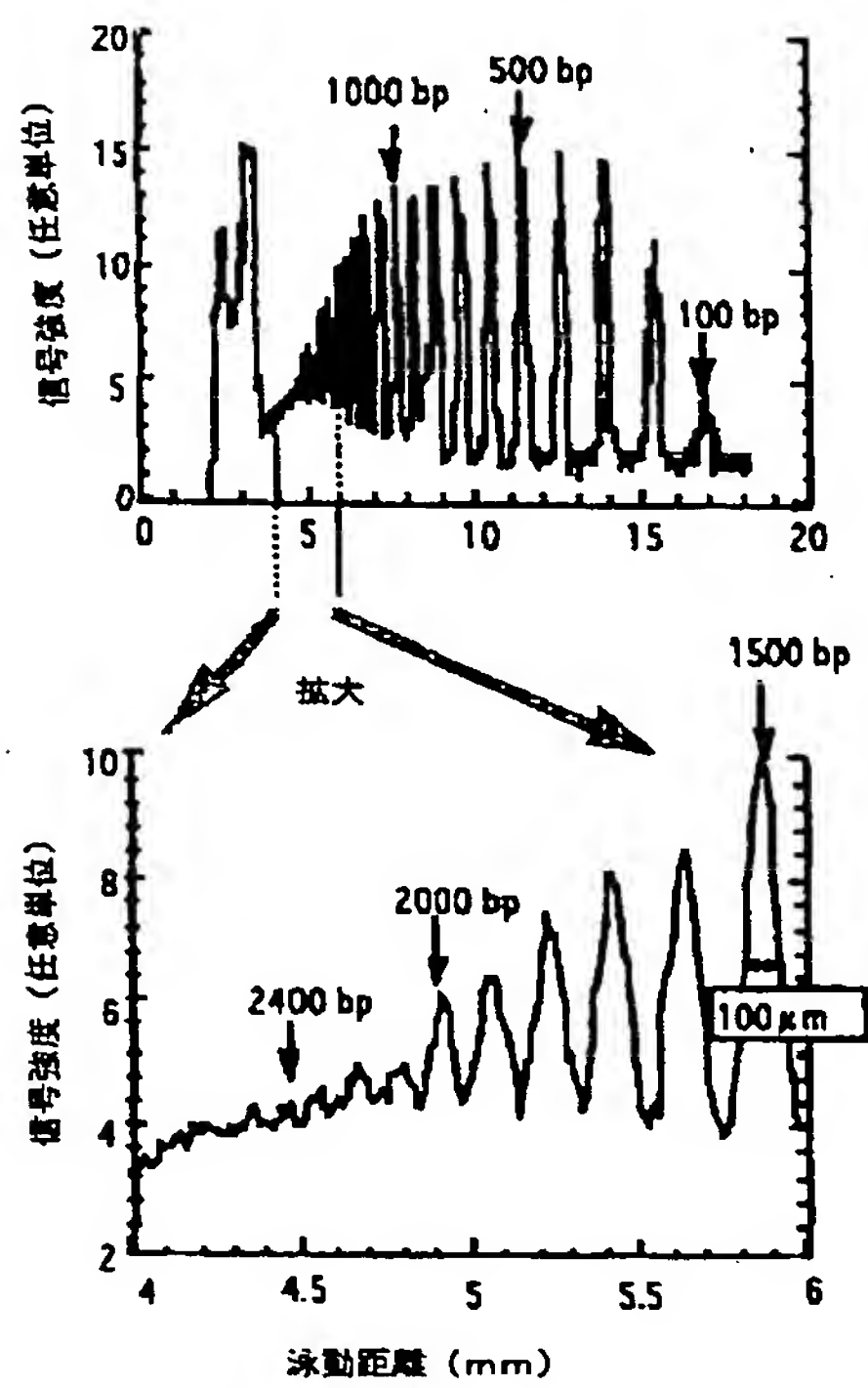
【図 2】



【図 4】

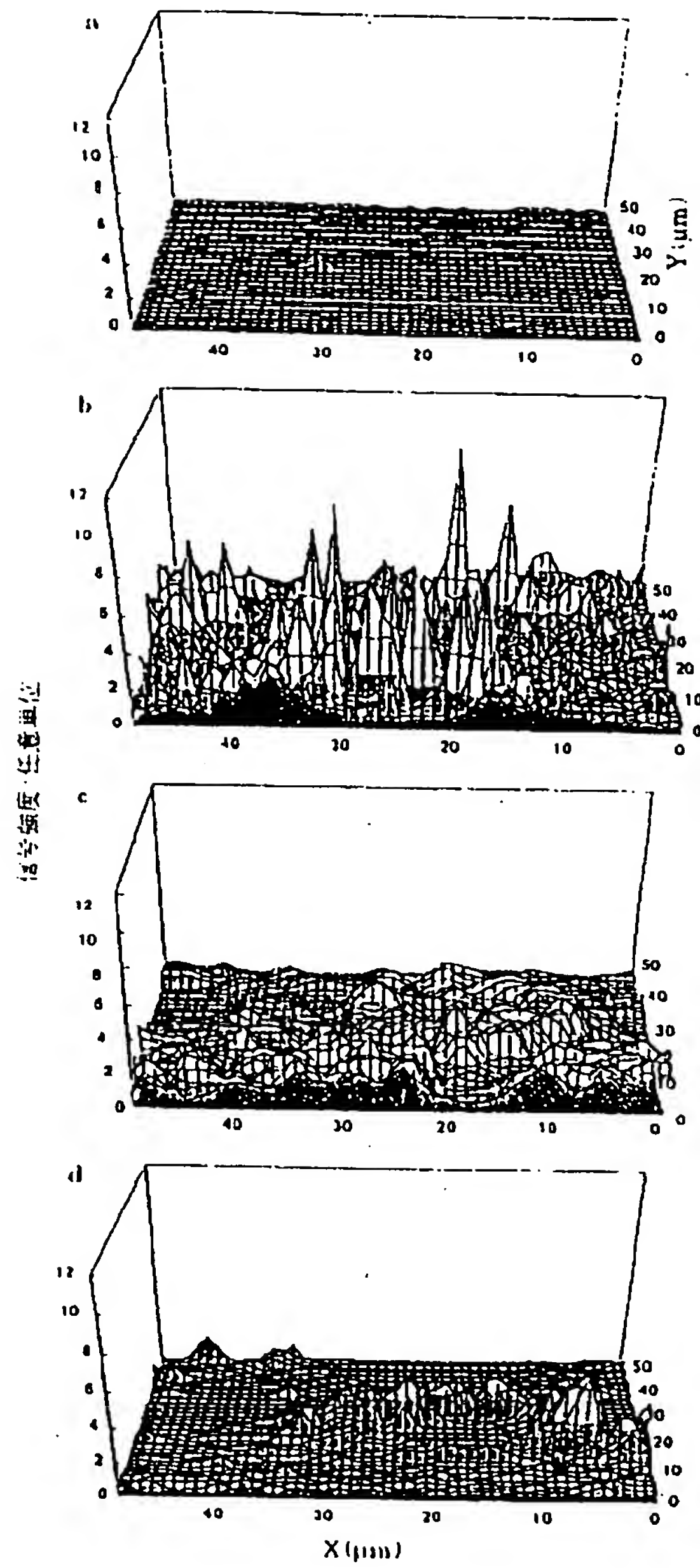


【図 6】





【図3】



BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**